

文章编号 1006-8147(2019)06-0605-05

论 著

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 及 IL-17 与复发性流产关系的研究

李萌萌, 杨小凤, 刘芳, 武明莉, 张芳

(郑州大学附属郑州中心医院妇产科, 郑州 450000)

摘要 目的:探讨 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(Tim-3)在复发性流产(RSA)发病机制中的作用。方法:选取 2017 年 12 月-2018 年 7 月郑州市中心医院妇产科收治的复发性流产患者 36 例为 RSA 组,同期 23 例健康早孕妇女作为正常早孕组(NP 组),29 例仅有少量阴道出血的早孕妇女为先兆性流产组(TA 组)。提取分离外周血单核细胞,流式细胞术检测 3 组研究对象外周血中 CD4⁺Tim-3⁺T 细胞;ELISA 检测 3 组研究对象血清中 IL-17 的表达;Pearson 相关分析 TA 组和 RSA 组患者 CD4⁺Tim-3⁺T 细胞与 IL-17 的相关性;Western blot 检测 RSA 组和 NP 组自愿人工流产患者绒毛组织中滋养细胞 Tim-3 蛋白的含量。结果:与 NP 组相比,TA 组和 RSA 组外周血单核细胞上 Tim-3 表达降低,外周血 IL-17 表达增高 ($P<0.05$);相关性分析提示 TA 组及 RSA 组外周血单核细胞上 Tim-3 与 IL-17 之间呈负相关;NP 组滋养细胞 Tim-3 蛋白的含量高于 RSA 组。结论:外周血单核细胞上 Tim-3 可能通过调节 IL-17 间接调节 Th17/Treg 细胞参与先兆流产和 RSA 的发生。

关键词 TIM-3;RSA;IL-17;单核细胞

中图分类号 R714.21

文献标志码 A

Relationship between Tim-3, IL-17 and recurrent spontaneous abortion

LI Meng-meng, YANG Xiao-feng, LIU Fang, WU Ming-li, ZHANG Fang

(Department of Obstetrics and Gynecology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of T cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) in the pathogenesis of recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods:** From December 2017 to July 2018, 36 patients with recurrent spontaneous abortion admitted to the Department of Obstetrics and Gynecology in Zhengzhou Central Hospital were included in the RSA group. In the same period, 23 healthy early pregnant women were used as the normal early pregnancy group, and 29 patients who had only a small amount of vaginal bleeding are a threatened abortion group. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation. CD4⁺Tim-3⁺ T cells were detected by flow cytometry in peripheral blood of the three groups. The expression of IL-17 in serum of the three groups was detected by ELISA. Pearson correlation analysis correlation between CD4⁺Tim-3⁺ T cells and IL-17 in RSA patients; Western Blot was used to determine the contents of Tim-3 protein in villus tissue of RSA group and NP group. **Results:** Compared with the NP group, the expression of Tim-3 decreased in peripheral blood mononuclear cells of the TA group and RSA group, and the expression of IL-17 in peripheral blood increased ($P<0.05$). Correlation analysis showed that there was a negative correlation between Tim-3 and IL-17 in peripheral blood mononuclear cells of TA group and RSA group. The content of Tim-3 protein in villus cells of induced abortion patients with early pregnancy was higher than that of RSA group. **Conclusion:** Tim-3 may regulate the involvement of Th17/Treg cells in TA and RSA by regulating the IL-17 in peripheral blood mononuclear cells.

Key words TIM-3; RSA; IL-17; monocyte

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指发生 2 次或者 2 次以上妊娠胚胎于妊娠 20 周之前丢失^[1],可能的致病因素包括遗传、内膜、生殖道感染以及免疫因素等,其发病机制的研究一直是生殖领域的热点^[2-4]。现有研究表明免疫因素在复发性流产中起到重要的作用,影响 RSA 免疫因素的原因主要是 Th17/Treg 细胞和其分泌的细胞因子

IL-17^[5]。在免疫相关因素研究当中,免疫反应中的共刺激分子的作用已经成为新的研究热点,其中 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecules-3, Tim-3) 是最新发现的一种具有负调控作用的刺激分子^[6],很多疾病的发生发展以及致病机制中都有 Tim-3 参与,例如自身免疫系统疾病、慢性感染性疾病、器官移植排斥反应和肿瘤免疫逃逸等,除上述之外还有研究报道了其可能参与到了母胎免疫耐受的诱导和维持作用^[7-8]。本实验拟通过研究 RSA 和先兆流产患

基金项目 河南省教育厅 2018 年度重点科研项目 (18B310036)

作者简介 李萌萌 (1987-),女,住院医师,硕士,研究方向:生殖内分泌;通信作者:杨小凤, E-mail: ta57di@163.com。

者以及正常早孕患者外周血中 Tim-3 在单核细胞上的表达水平及 Th17/Treg 细胞分泌因子 IL-17 的分泌情况,通过相关性分析研究 Tim-3 和 IL-17 之间的关系,为临床上 RSA 发病机制和治疗提供新的依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2017 年 12 月-2018 年 7 月郑州大学附属郑州中心医院妇产科收治的 23 例健康早孕妇女作为正常早孕组(NP 组),29 例仅有少量阴道出血的早孕妇女为先兆流产组(TA 组),复发性流产患者 36 例为 RSA 组。诊断标准为:有停经史;HCG 检测阳性,B 超发现有宫内妊娠早期现象;阴道有少量出血情况,没有妊娠物排出,连续自然流产 2 次或者 2 次以上的患者。排除由非免疫因素胚胎染色体异常引起的先兆性流产和复发性流产患者。3 组研究对象均无慢性病、不良生育史和家族遗传病史。本实验由郑州大学附属郑州中心医院伦理委员会批准并签署知情同意书。见表 1。

表 1 3 组研究对象基本资料

Tab 1 Basic data of the three groups of subjects

分组	例数	年龄/岁	孕酮/(ng/mL)	孕周/d	妊娠囊/mm
NP 组	23	28.24±5.18	19.23±6.70	51.27±9.73	28.38±9.00
TA 组	29	27.45±3.47	23.56±7.23	52.57±7.81	30.30±9.60
RSA 组	36	31.87±4.23	25.25±8.38	53.12±6.78	29.00±11.20
P		0.37	0.51	0.73	0.76

1.2 试剂和仪器 主要试剂:鼠抗人 CD4-FITC(英国 Abcam 公司)、Tim-3-PE(英国 Abcam 公司);同型对照鼠 MouseIgG1-FITC/PE;人 IL-17 ELISA 试剂盒(美国 RCHO 公司)。主要仪器:流式细胞分析仪(美国 BD 公司);气套式三气培养箱(美国 Thermo 公司);多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);高压灭菌器(日本 TOMY 公司);HPIAS-1000 图像分析(美国 Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和分离外周血单核细胞 研究对象均于无菌条件下抽取外周肘静脉血 5 mL,肝素抗凝,以 PBS 等量稀释后,缓慢沿管壁轻轻加入人淋巴细胞分离液,2 500 r/min 离心 25 min,吸取云雾状单核细胞层,再次加入生理盐水后 2 000 r/min 离心

20 min 反复洗涤 2 次,获取单核细胞。

1.3.2 流式细胞术分析 CD4⁺单核细胞表面的 Tim-3 表达水平 调节单核细胞悬液浓度为 $10 \times 10^6/\text{mL}$,每 100 μL 加入 FITC 标记的抗人 CD4 抗体 5 μL 以及 PE 标记的抗人 Tim-3 抗体 5 μL ,避光孵育 30 min,同时设立相应的同型对照,染色缓冲液洗涤后,在流式细胞仪进行相应的分析。

1.3.3 ELISA 法检测血浆中细胞因子含量 将-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的血浆置于室温下解冻,3 000 r/min 离心 5 min,严格按照 ELISA 试剂盒说明步骤操作,450 nm 测 OD 值,根据标准品浓度及 OD 值绘制标准曲线,比较各组血浆中 IL-17 的表达情况。

1.3.4 Western blot 检测组织上滋养细胞 Tim-3 的表达 RSA 组患者和 NP 组患者分别于自然流产和人工流产手术后,无菌条件下收集各组相对新鲜的流产组织,选取绒毛或蜕膜组织,取 1~2 g 在液氮中研碎液氮冷冻,随后进行碾磨,裂解液裂解,低温离心取上清,即为组织蛋白。蛋白定量完成后加上样缓冲液,沸水煮 5 min,样品可冻于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。SDS-PAGE 电泳后进行转膜操作,转膜成功后用脱脂牛奶进行封闭,PBST 清洗,裁剪条带并分别加入相应抗体,均为 1:1 000 稀释,室温孵育 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日反复清洗条带,加二抗室温孵育 90 min,PBS 反复冲洗,然后加 ECL 发光液,采用 HPIAS-1000 图像分析系统对目的条带进行扫描分析。以 β -actin 作为内参照,计算 Tim-3 相对光密度值。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 15.0 软件处理数据,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间计量资料比较采用 One-Way ANOVA 分析,相关性分析采用 Pearson 方法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 CD4⁺单核细胞上 Tim-3 表达 流式细胞术检测 3 组研究对象外周血中 CD4⁺单核细胞上 Tim-3 表达情况,TA 组和 RSA 组与 NP 组相比 Tim-3 表达降低,RSA 组表达低于 TA 组,各组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),图 1。

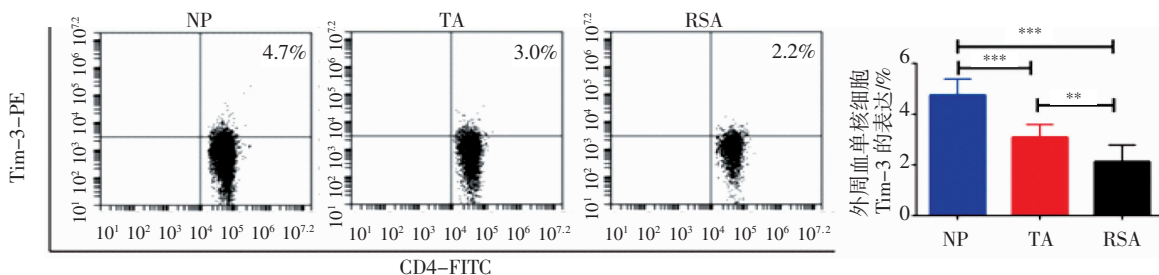


图 1 流式细胞仪分析 3 组外周血单核细胞上 Tim-3 的表达

Fig 1 Tim-3 expression of peripheral blood mononuclear cells in the three groups

2.2 3组研究对象血清中IL-17的表达 ELISA检测3组研究对象血清中IL-17表达情况,与NP组相比,其余两组血清中IL-17表达增高,而且RSA组高于TA组,差异具有统计学意义($P<0.05$),表2和图2。

表2 3组研究对象外周血IL-17水平比较

Tab 2 Comparison of IL-17 levels in peripheral blood of the three groups

指标	NP组	TA组	RSA组	F	P
IL-17	15.89±0.54	26.48±1.23	36.40±2.21	9.931	<0.001

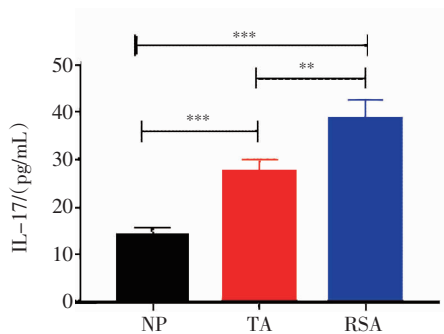


图2 IL-17在3组研究对象外周血中的表达

Fig 2 IL-17 expression in peripheral blood of the three groups

2.3 外周血单核细胞上Tim-3与IL-17相关性分析 流式和ELISA结果经Pearson相关性分析,RSA和TA组患者外周血Tim-3在单核细胞上的表达与Th17/Treg细胞分泌因子IL-17成负相关(图3),

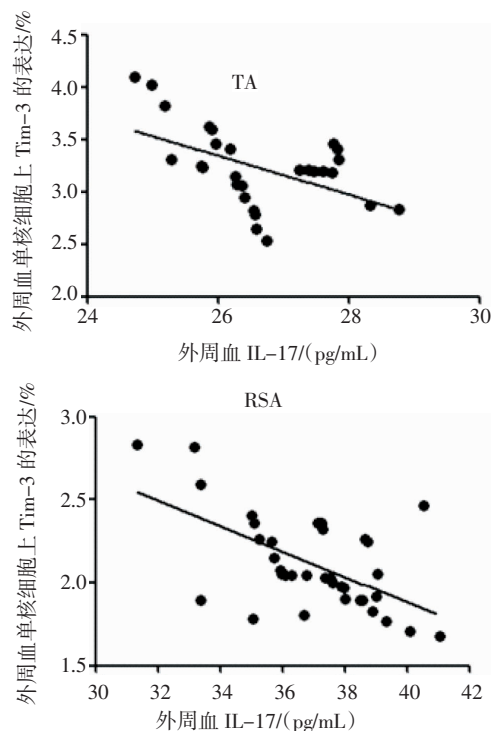


图3 RSA组和TA组Tim-3和IL-17相关性分析

Fig 3 Pearson analysis of the Tim-3 and IL-17 in RSA group and TA group

其中RSA组相关性($R^2=0.340, P<0.001$)高于TA组($R^2=0.266, P<0.001$)。

2.4 Tim-3和IL-17在NP组和RSA组滋养细胞中的表达分析 Western Blot检测RSA组和NP组患者滋养细胞中Tim-3蛋白表达,结果显示Tim-3在RSA组中表达低于NP组,而IL-17表达与之相反,差异具有统计学意义($P<0.05$),图4。

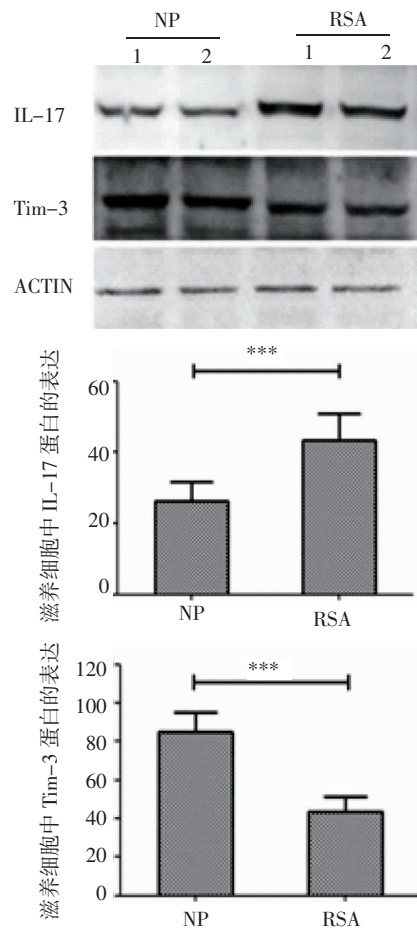


图4 Tim-3和IL-17在NP组和RSA组滋养细胞中的表达

Fig 4 Expression of the Tim-3 and IL-17 in trophoblast cells in the NP group and RSA group

3 讨论

RSA是指发生2次或者2次以上于妊娠20周之前的妊娠胚胎丢失,其可能的发病因素包括遗传、内膜、免疫因素以及生殖道感染等因素,免疫耐受是母体胚胎成功妊娠的基础,约有50%的复发性流产考虑与免疫因素有关^[9]。

现有研究表明,RSA和先兆性流产患者免疫功能经常处于一种失衡状态^[10]。如果在妊娠期间孕妇对胚胎的免疫耐受降低很有可能会导致流产的发生,流产是孕期常见的并发症,其早期表现仅仅是阴道少量出血,经过休息和相应治疗后仍继续妊娠

的称为先兆流产,如果出血量继续增加,下腹部疼痛剧烈,很可能发展为难免流产,是孕早期出现的疾病,发病率在12%~18%^[11]。

Tim-3 是最新发现的一种具有负调控作用的刺激分子,很多疾病的发生发展都有 Tim-3 参与,例如自身免疫系统疾病、慢性感染性疾病、器官移植排斥反应和肿瘤免疫逃逸等。在免疫反应的早期, Tim-3 可以抑制巨噬细胞的功能,比如 Tim-3 在 HCV 感染患者外周血的单核细胞上表达升高,抑制了其细胞活动^[12]。除此之外,还有研究报道其可能参与母胎免疫耐受的诱导和维持作用。在正常妊娠妇女,通过 IL-4/STAT6 信号通路, Tim-3 表达显著上调,而异常的 Tim-3 表达与妊娠丢失有关^[13]。Li^[14]的研究,外周 NK 细胞上的 Tim-3 会在孕早期短暂升高,发挥免疫抑制作用,抑制炎症因子的分泌,从而保证母体对胚胎的免疫耐受,减少妊娠丢失,除此之外,还能诱导 Treg 细胞的表达。Treg 是一种特异性表达 FOXP3 具有免疫调节功能的 CD4⁺细胞,其可以通过分泌细胞因子抑制炎症反应和维持自身的免疫耐受,因此, Treg 在数量和功能上的缺陷可能导致 RSA。

Th17 是新近发现的一类具有促进炎症作用的 Th 细胞亚群,其与机体炎症反应和免疫性疾病的发生和发展有着密不可分的联系,其可通过分泌细胞相关因子参与相关的生物学功能,在感染或损伤初期主要介导促炎反应,在多种自身免疫性疾病(如类风湿关节炎、银屑病等)中发挥重要作用,亦有研究显示其在妊娠期间呈动态变化,可能参与母胎免疫耐受的发生^[15]。Th17 细胞主要通过分泌 IL-17 发挥促炎作用,诱导促炎细胞因子的分泌,激活趋化因子和基质金属蛋白酶的表达^[16],还可以促进中性粒细胞的活化与聚集,从而引起组织细胞浸润和组织破坏。Th17 细胞还可加重母体对胎儿的免疫排斥作用,对妊娠不利。也有相关研究表明, Th17 细胞在 RSA 中比例明显增加,其分泌的 IL-17 也随之升高^[7],而 RSA 中 Th17/ Treg 比值升高,其与 RSA 的产生具有密不可分的关系^[18],经治疗后继续妊娠者的 Treg 逐渐增加^[19]。这些研究提示 Th17 和 Treg 细胞比例失衡在复发性流产中起到重要作用。

本研究首次通过 Tim-3 与 IL-17 在 NP 组、TA 组和 RSA 组中的表达情况分析之间可能存在的相关性,探讨 Tim-3 及 IL-17 与复发性流产的关系。通过流式细胞检测术、ELISA 和 Western blot 等研究方法发现, RSA 组与 TA 组和 NP 组相比,外周血中 CD4⁺单核细胞上 Tim-3 表达降低,而 Th17 细胞分

泌因子 IL-17 表达增高。经过 Pearson 相关性分析结果表明 Tim-3 表达与 IL-17 呈负相关关系。组织蛋白检测也表明, RSA 组中 Tim-3 表达降低而 IL-17 表达增高。说明 Tim-3 表达降低可能通过促进 IL-17 分泌间接调节 Th17/Treg, 导致先兆流产和 RSA 的发生。本研究首次阐述了 RSA 中 Tim-3 和 IL-17 的关系,为 RSA 和先兆性流产的临床治疗提供理论依据和新的治疗方案。

参考文献:

- [1] 钱正宇,王健,郭志强,等. Th17 和 Treg 细胞及其比例在先兆流产中的变化及意义[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(5):454
- [2] Chen C J, Hou J W, Chiang B L. The difference in immune response and IL-12 p35 methylation between newborns and adults[J]. J Biomed Sci, 2014, 6(56):76
- [3] Wu M R, Zhu Y E, Zhao J, et al. Soluble costimulatory molecule sTim3 regulates the differentiation of Th1 and Th2 in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(6):8812
- [4] Huang Y H, Zhu C, Kondo Y, et al. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion[J]. Nature, 2015, 517(7534):386
- [5] Müller A, Wagner J, Hodžić A, et al. Genetic variation in leptin and leptin receptor genes is a risk factor for idiopathic recurrent spontaneous abortion[J]. Croat Med J, 2016, 57(6):566
- [6] Krebs C F, Schmidt T, Riedel J H, et al. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(10): 647
- [7] Sha J, Liu F, Zhai J, et al. Alteration of Th17 and Foxp3+ regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after the therapy of hCG combined with immunoglobulin[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2):1114
- [8] 张钰, 王建梅, 顾艳, 等. 母胎界面趋化因子及其受体的表达与原因不明复发性流产发病的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(8):608
- [9] Larsen E C, Christiansen O B, Kolte A M, et al. New insights into mechanisms behind miscarriage[J]. BMC Med, 2013 (11): 154
- [10] Song X, He X, Li X, et al. The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(4):418
- [11] 郑艳萍, 杨菁. 原因不明性复发性流产患者 Th17/Treg 细胞失衡及主动免疫治疗效果[J]. 医学分子生物学杂志, 2015, 12(5):267
- [12] Zhu L Q, Chen H, Liu M L, et al. Treg/Th17 cell imbalance and IL-6 profile in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Reprod Sci, 2017, 24(6):882
- [13] Zhao J, Zhang L, Liu Y Y, et al. Human pregnancy up-regulates Tim-3 in innate immune cells for systemic immunity[J]. J Immunol, 2009, 182:6618
- [14] Li Y, Zhang J, Zhang D, et al. Tim-3 signaling in peripheral NK cells promotes maternal-fetal immune tolerance and alleviates pregnancy loss[J]. Sci Signal, 2017, 10(498):Pii:eaah4323.
- [15] Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(2):373

(下转第 614 页)

关节面较正常行走中立位时接触面积缩小,局部压力增加。可见,踝穴大小形态决定踝关节稳定性,一旦发生扭伤或脱位,上述结构发生改变,踝关节稳定性下降^[4]。

3.2 正常行走及扭伤时,各节点 Von Mises 应力分布情况 通过踝足有限元模型的有效应力云图,观察距骨运动情况,发现正常行走时,距骨在踝穴滑动,Von Mises 应力主要集中在距骨外突、距骨后突、距舟关节、距骨颈、距下关节和胫距关节后关节面,最大 Von Mises 应力主要集中在距骨外突和距骨后突。踝内翻扭伤时,距骨 Von Mises 应力情况发生改变,应力较正常行走更加集中,位置相对变少,主要集中在距舟关节、距骨颈和距骨侧突,胫距关节面应力也向关节周边集中。以上分析踝内翻扭伤应力变化与临床外踝损伤患者常见骨损伤部位相符^[5]。

3.3 纵向力、横向力对踝内翻扭伤的影响 纵向力作用下,内翻模型的距骨颈有效应力由正常行走中立位时的 3.84 MPa 上升到 12.02 MPa,内踝有效应力由 4.93 MPa 上升到 16.4 MPa,约为正常的 3 倍,明显高于正常行走中立位模型,有统计学意义。外踝有效应力由 15.62 MPa 下降到 6.43 MPa,距下关节有效应力由 16.30 MPa 下降到 8.61 MPa,约降低 2~2.5 倍,较正常行走中立位模型明显下降,有统计学意义。踝内翻扭伤时,距骨内上有效应力增大,外下有效应力减少,前后有效应力变化幅度较小。施加横向力,正常行走中立位模型和内翻扭伤模型距骨各节点的有效应力出现不同程度的变化^[6],但均未出现显著差异,无统计学意义。外踝与距下关节应力较正常减少,其余节点应力均增加。由此可见

踝内翻扭伤过程中,虽然横向剪切力为主要外力,但它对踝关节诸骨影响较小,真正对踝关节诸骨有明显影响作用的是纵向力。

3.4 本研究的临床意义 通过以上分析,我们知道了踝内翻扭伤时距骨在踝穴的运动情况,距骨有效应力重新分布,受力点及力的大小均发生改变。也知道了纵向力决定踝内翻扭伤严重程度。进而得出结论,一旦发生踝内翻扭伤,患者应尽早卧床,增加休息,减少站立,从而减少纵向力影响,使踝关节尽快恢复。并及时纠正因内翻扭伤引起的踝关节生物力学变化,防止因外踝扭伤养护不当造成踝关节稳定性下降、习惯性崴脚及关节炎的发生。

参考文献:

- [1] 陈波杰,丁真奇.有限元分析在骨折愈合与生物力学研究中的应用[J].广东医学,2015,36(8):1288
- [2] Klekiel T, Bedzinski R. Finite element analysis of large deformation of articular cartilage in upper ankle joint of occupant in military vehicles during explosion[J]. Arch Metall Mater, 2015, 60(3):2115
- [3] 刘建永,王英振,姜鑫.慢性踝关节外侧不稳定解剖重建与修复疗效的比较观察[J].中国矫形外科杂志,2015,23(18):1667
- [4] Halonen K S, Mononen M E, Jurvelin J S, et al. Deformation of articular cartilage during static loading of a knee joint - experimental and finite element analysis[J]. J Biomech, 2014, 47(10):2467
- [5] 戴海飞,余斌,张凯瑞,等.踝关节周围韧带损伤对距骨稳定性影响的有限元分析[J].中国骨与关节损伤杂志,2012,27(2):121
- [5] 戴海飞,余斌,张凯瑞,等.踝关节周围韧带损伤对距骨稳定性影响的有限元分析[J].中国骨与关节损伤杂志,2012,27(2):121
- [6] Coster M C, Rosengren B E, Bremander A, et al. Surgery for adult acquired flatfoot due to posterior tibial tendon dysfunction reduces pain, improves function and health related quality of life[J]. Foot Ankle Surg, 2015, 21(4):286

(2018-11-18 收稿)

(上接第 608 页)

- [16] Brazao V, Kuehn C C, Dos Santos C D, et al. Endocrine and immune system interactions during pregnancy [J]. Immunobiology, 2015, 220(1):42
- [17] 高勇,宋月,安万新,等.外周血 Th17 及 CD4+CD25+Foxp3+调节性 T 细胞失衡与不明原因反复自然流产的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(10):1036
- [18] Liu Y S, Wu L, Tong X H, et al. Study on the relationship between

Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 65(5):503

- [19] Inada K, Shima T, Nakashima A, et al. Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content[J]. 2013, 97(1):104

(2018-10-08 收稿)